GenoType® MTBC
Extraction et Amplification de l'ADN Mycobactérien

Introduction

Ce protocole décrit l'amplification multiplex de fragment d'ADN en vue de la différentiation du complexe *Mycobacterium tuberculosis* par hybridation inverse.

La PCR est couverte par des brevets détenus par la société Hoffmann-La Roche. Aucune autorisation, licence implicite ou explicite pour la pratique de la PCR ni aucune autre méthode utilisant la PCR ne sont couvertes en cas d'acquisition de cette trousse. Les informations sur l'obtention d'une licence pour la pratique de la PCR ou sur d'autres méthodes utilisant la PCR peuvent être obtenues en contactant F. Hoffmann-La Roche AG, CH – 4002 Basel.

Conservation et Précautions

Dès réception, conserver le mélange Amorces/Nucléotides (PNM) à 2–8°C et isolés de toute source d'ADN potentiellement contaminante. Si la durée de conservation doit excéder 4 semaines, conserver à –20°C. Il est recommandé d'aliquoter le mélange PN afin d'éviter les congélations/décongélations répétées. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.

Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et être manipulés comme tel. Observer les précautions usuelles pour la préparation de l'amplification. Il est essentiel que le matériel et les réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN et pour la préparation de la PCR soient exempts de DNases. Ne pas mélanger les réactifs provenant de différents lots de trousses.

Matériel Requis mais Non Fourni

- ADN polymérase thermostable avec tampon (enzyme de type «hot start» recommandée, taux d'extension : (2–4 kb/min à 72°C, demi-vie : 10 min à 97°C, 60 min à 94°C, rendement d'amplification : >10^5)
- Bloc chauffant (précision +/–1°C)
- Centrifugeuse de paillasse
- Eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire)
- Embouts de pipettes stériles avec filtre
- Gants à usage unique
- Huile minérale, niveau de pureté pour Biologie Moléculaire (pour thermocycleur sans couvercle chauffant)
- Kit pour l'extraction de l'ADN et réactifs associés
- Micro-tubes pour extraction de l'ADN (1,5 ml) et tubes pour thermocycleur; exempt de contamination par DNase et RNase
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200, et 1000 µl
- Thermocycleur (taux de chauffage : 3°C/sec, taux de refroidissement : 2°C/sec, précision : +/–0,2°C)

Extraction de l'ADN

L'ADN peut être extrait à partir de bactéries cultivées en milieu solide (ex : Löwenstein-Jensen, Middlebrook) ou en milieu liquide (ex : Bactec, MB-Check). **Le test ne doit pas être utilisé pour la détection directe de mycobactéries à partir de prélèvements de patients.** L'espace de travail doit être exempt de toute trace d'ADN amplifié. Il est primordial de chauffer les échantillons à 95–105°C pendant au moins 15 minutes de manière à lyser toutes les cellules et à inactiver les bactéries à l'état végétatif. Toutes les procédures d'extraction de l'ADN à partir de bactéries et produisant de l'ADN amplifiable peuvent être employées.
Le protocole d'extraction rapide décrit ci-après permet également de préparer l'ADN en vue d'une amplification :

1a. A partir de bactéries cultivées en milieu solide : à l'aide d'une oeuse standard, prélever quelques colonies et les mettre en suspension dans 1 ml d'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire).

1b. A partir de bactéries cultivées en milieu liquide : Prélever directement 1 ml de milieu. Centrifuger pendant 5 minutes à 5000–6000 x g (7500–8000 rpm) sur une centrifugeuse de paillasse. Jeter le surnageant et reprendre le culot par 1 ml d'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire). Vortexer.
L'utilisation d'un trop grand nombre de bactéries peut inhiber l'amplification. Réduire la quantité de matériel de départ lorsque des cultures de haute densité sont utilisées.

2. Après les phases 1a ou 1b, centrifuger pendant 5 minutes à 5000–6000 x g (7500–8000 rpm) sur une centrifugeuse de paillasse.

3. Jeter le surnageant et reprendre le culot par 300 µl d'eau distillée (voir ci-dessus). Incuber 15–30 minutes à 95–105°C (Bloc chauffant ou bain-marie bouillant).

4. Soniquer pendant 15 minutes dans un bain à ultra-sons.

5. Centrifuger 5 minutes à vitesse maximale. Utiliser directement 5 µl de surnageant pour la PCR. Si la solution d'ADN doit être conservée de façon prolongée, transférer le surnageant dans un tube étiqueté.

Un protocole détaillé peut être obtenu chez votre distributeur ou à l'adresse internet : http://www.hain-lifescience.de/pdf/dnaisol_myco.pdf

Préparation de la PCR

Préparer le mélange réactionnel (45 µl) dans une pièce exempte d'ADN. L'échantillon d'ADN doit être rajouté dans une pièce séparée.

Préparer le mélange suivant par tube :

- 35 µl de mélange Amorces/Nucléotides (PNM)
- 5 µl de tampon d'incubation de la polymérase 10x – non fourni
- x µl de $MgCl_2$[1] – non fourni
- 1–2 *unité(s)* d'ADN polymérase thermostable (se référer au manuel) – non fourni
- y µl d'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire) qsp 45 µl (hors volume de l'enzyme) – non fourni
- Ajouter 5 µl de solution d'ADN (20–100 ng d'ADN) pour atteindre un volume final de 50 µl (hors volume de l'enzyme)

[1] Selon le système tampon/enzyme utilisé, la concentration optimale de $MgCl_2$ peut varier de 1,5 à 2,5 mM. A noter que certains tampons contiennent déjà le $MgCl_2$.

Déterminer le nombre d'échantillons à amplifier (nombre d'échantillons à analyser + contrôles). Pour un contrôle négatif, par example, la solution d'ADN à amplifier est remplacée par 5 µl d'eau. Préparer une solution mère de mélange réactionnel contenant tous les réactifs à l'exception de l'ADN, et bien homogénéiser (ne pas vortexer).

Si le thermocycleur ne possède pas de couvercle chauffant, recouvrir les échantillons d'huile minérale.

Profil d'Amplification

5 min[2]	95°C	–	1 cycle
30 sec	95°C	–	10 cycles
2 min	58°C	–	
25 sec	95°C	–	20 cycles
40 sec	53°C	–	
40 sec	70°C	–	
8 min	70°C	–	1 cycle

[2] La durée de cette étape doit être rallongée en cas d'utilisation d'ADN polymérase de type «hot start» (se référer au manuel de l'enzyme).

Selon le thermocycleur utilisé, le profil d'amplification peut demander des modifications (contacter votre distributeur).
Les produits de l'amplification peuvent être conservés à +4 ou –20°C.

La réaction d'amplification peut être contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose 2% en déposant directement 5 µl de chaque échantillon (sans aucun tampon additionnel). Les amplicons ont une longueur de 215 pb (Contrôle Universel), de 152 pb et 203 pb (gène *gyrB*). La souche BCG présente un amplicon supplémentaire de 106 pb.

Fabricant

Hain Lifescience GmbH, Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Allemagne
http://www.hain-lifescience.de

CE

GenoType® MTBC
Test Génétique de Différentiation du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* après Culture

Principe

Le test **GenoType® MTBC** est basé sur la technologie **DNA•STRIP®** qui permet la différentiation génétique des espèces/souches appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis*, à savoir: *M. africanum I, M. bovis BCG, M. bovis ssp. bovis, M. bovis ssp. caprae, M. microti* et *M. tuberculosis/M. africanum II/M. canettii.* La procédure complète comporte trois phases : extraction de l'ADN à partir de cultures (matériel requis pour l'extraction de l'ADN non fourni), amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées (ADN polymérase thermostable non fournie), et détection de l'ADN amplifié par hybridation inverse. Cette dernière phase comporte les étapes suivantes : dénaturation chimique de l'ADN amplifié, hybridation des amplicons simples brins biotinylés aux sondes pré-immobilisées sur la membrane, lavage stringent, et enfin addition d'un conjugué streptavidine / phosphatase alcaline suivie d'une révélation chromogénique. Les signaux obtenus sont facilement et rapidement interprétés à l'aide d'une matrice fournie avec chaque trousse.

Précautions

Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et être manipulés comme tel. Les échantillons prélevés sur des patients à risques doivent être identifiés et manipulés dans des conditions de sécurité adéquates. Suivre les recommandations (fédérale, nationale, locale) d'hygiène, de sécurité et d´environment. Se protéger à l'aide de vêtements adéquats et de gants.

Lors de la manipulation du kit, tenir compte des indications de sécurité suivantes :
La **Solution de Dénaturation** (DEN) contient du NaOH (<2%) et est irritante pour la peau et les yeux (R36/38 et S26, S37/39, S45).
Le **Substrat Concentré** (SUB-C) contient Dimethyl Sulfoxide et est irritante (R36/37/38, S23-26-36).
Pour des informations supplémentaires, consulter les fiches de sécurité.

Contrôle de Qualité

Afin de contrôler le bon déroulement du test et le bon fonctionnement des réactifs, chaque bandelette comporte deux zones de contrôle :

- une zone «Contrôle Conjugué» pour confirmer la fixation du conjugué sur la bandelette et le bon déroulement de la révélation chromogénique
- une zone de «Contrôle Universel» qui détecte toutes les mycobactéries connues ainsi que les bactéries gram-positive riches en G+C

Procédure

Préparation
Préchauffer bain-marie agitateur/**TwinCubator®** à exactement **45°C** +/-1°C. Préchauffer les solutions HYB et STR à 37–45°C avant utilisation. Les réactifs ne doivent présenter aucun précipité (à noter cependant que la solution CON-D est opaque). Si besoin, agiter. Equilibrer les autres réactifs (à l'exception de les solutions CON-C et SUB-C) à température ambiante. Dans un tube approprié, diluer le Conjugué Concentré (CON-C, orange) et le Substrat Concentré (SUB-C, jaune) au 1 :100 dans un volume adéquat du tampon correspondant **(CON-C avec CON-D, SUB-C avec SUB-D)**. Bien homogénéiser et équilibrer à température ambiante. Pour chaque échantillon testé, ajouter 10 µl de concentré à 1 ml de tampon. Diluer CON-C avant chaque utilisation. Une fois dilué, SUB-C reste stable pendant 4 semaines conservé à température ambiante et à l'obscurité.

1. **Déposer 20 µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puit utilisé.**
2. **Ajouter 20 µl d'échantillon amplifié et mélanger les deux solutions par pipetages répétés. Incuber 5 minutes à température ambiante.**
   Pendant ce temps, à l'aide d'une pince, sortir du tube le nombre approprié de bandelettes (STRIPS), et inscrire au crayon leur numéro d'identification dans l'espace situé sous la ligne de repère. Toujours porter des gants pour manipuler les bandelettes.
3. **Ajouter dans chaque puit 1 ml de Tampon d'Hybridation (HYB, vert) préchauffé et homogénéisé. Homogénéiser jusqu'à ce que le mélange devienne une couleur homogène.**
   Eviter les éclaboussures vers les autres puits.
4. **Déposer une bandelette dans chaque puit utilisé.**
   Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face sensibilisée (identifiable par la ligne de repère) tournée vers le haut. Les bandelettes mal orientées doivent être remises en position à l'aide de pincettes pro-

MTBC
Cette zone s'hybride avec les amplicons générés à partir de tous les membres connus du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

Bandes 4–13
Sondes spécifiques ; utiliser le tableau d'interprétation ci-après pour l'évaluation des résultats.

Le tableau d'interprétation

	M. tuberculosis/ M. africanum II/ M . canettii	M. africanum I	M. microti	M. bovis ssp.bovis	BCG	M. bovis ssp.caprae
1	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	
5	–	–	–			–
6	–	–	–			
7	–	–		–	–	–
8	–					
9				–	–	
10		–	–	–	–	–
11			–			
12						–
13					–	

– : Signal positif
Bande No. 1: Contrôle Conjugué
Bande No. 2: Contrôle Universel
Bande No. 3: bande spécifique de MTBC

Des bandes non spécifiques peuvent apparaître en fonction des conditions réactionnelles. Dans ce cas, seules les bandes présentant une intensité environ égale ou supérieure à celle de la zone de contrôle universel sont à prendre en compte.

Limitations

Pour l'amplification, l'ADN doit être extrait à partir de culture de bactéries à l'aide d'une methode appropriée. L'ADN cible doit avoir été correctement amplifié. Le test fonctionne seulement dans la limite des régions génomiques choisies pour la différentiation du complexe *M. tuberculosis*. Le séquençage ou l'analyse des résistances aux antibiotiques doivent être réalisés séparément.

Causes d'Erreurs

Résultats faibles ou absence de signal (incluant la zone de contrôle conjugué)
- Température ambiante trop basse ou réactifs mal équilibrés.
- CON-C et/ou SUB-C trop dilué ou CON-D et/ou SUB-D utilisé sans dilution préalable.

Résultats faibles ou absence de signal, excepté dans la zone de contrôle conjugué
- La qualité et/ou la quantité de l'ADN extrait n'ont pas permis une amplification correcte. Analyser l'ADN amplifié sur un gel d'agarose 2%. Si aucun amplicon n'est visible, répéter les étapes d'extraction et d'amplification. Essayer éventuellement une autre méthode d'extraction de l'ADN (se reporter au manuel »Extraction et Amplification de l'ADN Mycobactérien»).
- Température d' incubation trop élevée.
- L'espèsce bacterienne isolée ne pas être identifée par la contrôle universel.

Coloration non homogène
- Les bandelettes n'ont pas été suffisamment immergées lors des différentes incubations.
- Le portoir n'a pas été correctement agité.

Bruit de fond important
- CON-C et/ou SUB-C trop concentré.
- Les étapes de lavage n'ont pas été correctement effectuées.
- Les solutions de lavage étaient trop froides lors de leur utilisation.

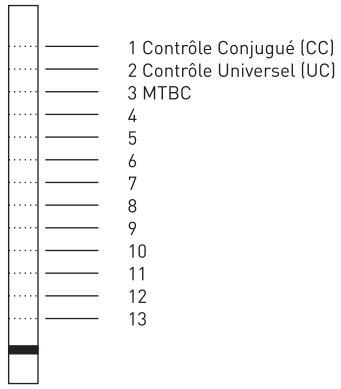
Profil obtenu différent des profils indiqués dans le tableau d'interprétation
- Fausse température d' incubation.
- Tampon d'Hybridation et/ou Solution de Lavage Stringent non suffisamment préchauffés ou homogénéisés.
- Eclaboussures pendant l'addition du Tampon d'Hybridation.
- La rapidité et l'intensité du développement colorée est fonction de la quantité d'ADN amplifié et des conditions de réaction. En cas de développement coloré

pres. Afin d'éviter toute contamination, bien nettoyer les pincettes après chaque utilisation. Cella vaut aussi pour tous les étapes suivantes.

5. **Placer la plaque dans bain-marie agitateur/TwinCubator® et incuber 30 minutes à 45°C.**
   Pour le bain-marie agitateur sélectionner une fréquence d'agitation suffisante pour assurer un bon brassage de tampon. Ajuster le niveau de l'eau dans le bain-marie agitateur à mi-hauteur des puits de façon à assurer un bon transfert de chaleur. Cela vaut aussi pour tous les étapes suivantes.
6. **Aspirer le contenu des puits.**
   Utiliser par exemple une pipette pasteur reliée à une pompe à vide.
7. **Ajouter à chaque puit 1 ml de Solution de Lavage Stringent (STR, rouge) et incuber 15 minutes à 45°C dans bain-marie agitateur/TwinCubator®.**
8. **A partir de cette étape, travailler à température ambiante.**
   Eliminer la Solution de Lavage Stringent.
   Vider la Solution de Lavage Stringent dans un container à déchets. Eliminer tout le liquide résiduel en retournant les puits sur du papier absorbant (effectuer de même pour les autres étapes de lavage).
9. **Laver chaque puit avec 1 ml de Solution de Rinçage (RIN) et incuber pendant une minute sous agitation. Vider la Solution de Rinçage.**
10. **Ajouter à chaque puit 1 ml de Conjugué dilué (voir ci-dessus) et incuber sous agitation 30 minutes.**
11. **Vider le contenu des puits et rincer sous agitation 1 minute à l'aide de 1 ml de Solution de Rinçage (RIN). Vider RIN. Répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois avec environ 1 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.**
    Bien éliminer toute trace d'eau dans les puits après cette dernière étape.
12. **Ajouter 1 ml de Substrat dilué (voir ci-dessus) dans chaque puit et incuber sans agitation à l'obscurité.**
    Le temps de révélation peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 minutes), notamment de la température de la pièce. Des temps de révélation trop longs peuvent entrainer un bruit de fond qui peut géner l'interprétation des résultats.
13. **Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.**
14. **A l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher entre deux couches de papier absorbant.**

Lecture et Interprétation des Résultats

Classer et ranger les bandelettes en les protégeant de la lumière. Une matrice est fournie avec la trousse, mais peut également être téléchargée à l'adresse suivante : http://www.hain-lifescience.de/pdf/mtbc_evaluation.pdf. Utilisation de la matrice : coller les bandelettes dans leur emplacement réservé, en alignant les bandes CC et UC des bandelettes avec les bandes CC et UC de la matrice. Noter les bandes positives dans l'avant-dernière colonne, et déterminer l'espèce correspondante à l'aide du tableau d'interprétation. Noter le résultat dans la dernière colonne. La matrice permet également d'évaluer les résultats en alignant de la même façon les bandes CC et UC des bandelettes et de la matrice.
Chaque bandelette contient 13 zones réactionnelles (voir figure).



Contrôle Conjugué (CC)
Une ligne colorée doit se développer dans cette zone. Cette ligne témoigne de la bonne fixation du conjugué et le bon déroulement de la révélation.

Contrôle Universel (UC)
Dans cette zone sont détectées toutes les mycobactéries connues ainsi que les bactéries gram-positives riches en G+C. Lorsque cette zone et la zone Contrôle Conjugué développent une ligne colorée alors que le reste du profil ne permet pas d'identifier spécifiquement une espèce mycobactérienne, celle-ci doit être identifiée par une méthode supplémentaire. Seules les lignes colorées d'intensité environ égale ou supérieure à celle du Contrôle Universel doivent être prises en compte pour l'interprétation. Lorsqu'une quantité importante d'amplicons a été utilisée pour l'hybridation, d'autres bandes peuvent occasionnellement apparaître. (voir paragraphe «Causes d'Erreurs»).

rapide, l'incubation du substrat doit être arrêtée dès que les signaux sont clairement visibles, afin de prévenir toute hybridation croisée.
- Contamination de l'ADN extrait et/ou des réactifs d'amplification avec de l'ADN précédemment extrait et/ou amplifié. Si les réactifs d'amplification sont contaminés, un contrôle négatif entraîne également le développement de bandes colorées.
- La culture de départ n'est pas pure.
- L'espèce bactérienne isolée ne peut pas être identifiée avec ce test.

Composition du Kit

	Quantité	
Bandelettes sensibilisées avec les sondes spécifiques (STRIPS)	12	96
Mélange PN (PNM) contient amorces spécifiques, nucléotides, colorant	0,5 ml	4 ml
Solution de Dénaturation (DEN) ***prêt à l'emploi*** contient <2% NaOH, colorant	0,3 ml	2,4 ml
Solution d'Hybridation (HYB) ***prêt à l'emploi*** contient 8–10% de détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Lavage Stringent (STR) ***prêt à l'emploi*** contient >25% d'un sel d'ammonium quaternaire, <1% détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Rinçage (RIN) ***prêt à l'emploi*** Milieu tamponné, <1% NaCl, <1% de détergent anionique	50 ml	360 ml
Conjugué Concentré (CON-C) ***concentré*** contient de la phosphatase alcaline conjugué à la streptavidine, colorant	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Conjugué (CON-D) Milieu tamponné, 1% agent bloquant, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrat Concentré (SUB-C) ***concentré*** contient Dimethyl Sulfoxide, composé chromogénique	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Substrat (SUB-D) Milieu tamponné, <1% NaCl, <1% $MgCl_2$	20 ml	120 ml
portoir, feuille de lecture	1 de chaque	4 de chaque
manuel d'utilisation, matrice	1 de chaque	1 de chaque

Matériel Requis mais Non Fourni

- Bain-marie agitateur/**TwinCubator®**
- Chronomètre
- Eau distillée
- Embouts de pipettes (de préférence stériles avec filtre)
- Eprouvette
- Gants à usage unique
- Papier absorbant
- Pincettes
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200, et 1000 µl
- Plateau agitateur
- Thermomètre calibré

Données Techniques

Echantillon requis:	Culture bactérienne
Volume nécessaire:	20 µl de solution d'ADN amplifié par échantillon
Durée du test:	approximativement 2 heures
Conservation:	2–8°C; pour conserver >4 semaines, le mélange PN doivent être conservés à –20°C

Art. No.: 301 12 tests
Art. No.: 30196 96 tests

Fabricant

Hain Lifescience GmbH, Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Allemagne
http://www.hain-lifescience.de

CE

HAIN LIFESCIENCE

Packungsbeilage lesen
consult operating instructions
Consulter le manuel d'utilisation

Chargennummer
batch code
Numéro de lot

Positivkontrolle
positive control
Contrôle positif

Temperaturbereich
temperature limitation
Limite de température

Haltbar bis
use by
A utiliser avant

Bestellnummer
catalogue number
Référence

Nur für den *in vitro*-Gebrauch
for *in vitro* use only
Pour usage *in vitro* uniquement